

PENGUNAAN CAIRAN FOLIKEL DALAM MEDIA MATURASI *IN VITRO* OOSIT KAMBING BLIGON

The Influence of Follicular Fluid on In Vitro Developmental Competence Media of Bligon Goat Oocytes

Diah Tri Widayati¹, Devita Hery Fatmawati¹, Nony Ariesta¹, dan Kustono¹

¹Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: widayati@ugm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh medium maturasi terhadap kompetensi perkembangan *in vitro* oosit kambing bligon. Ovarium kambing diperoleh dari Rumah Potong Hewan, dibawa ke laboratorium dalam 0,9% NaCl pada suhu 31-34° C. Oosit diaspirasi dari folikel berdiameter 2-6 mm dengan menggunakan *syringe* 3 ml dan jarum 23 G. Oosit dengan minimal 2 lapisan sel-sel kumulus diproses untuk maturasi *in vitro*. Oosit dicuci 3 kali dengan *dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) dan *tissue culture medium* 199 (TCM) 199, kemudian didistribusikan ke dalam 50 µl medium maturasi yang berbeda, yaitu TCM 199 (tanpa suplementasi), medium 199+20% *fetal calf serum* (FCS), medium 199+20% cairan folikuler (FL), dan ditutup dengan minyak mineral. Selanjutnya oosit diinkubasi pada 38° C, kelembaban udara 95%, dan 5% CO₂ selama 24 jam. Data dianalisis menggunakan analisis varian satu arah. Kualitas oosit setelah maturasi dianalisis secara deskriptif berdasarkan morfologinya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium 199+20% FC dan medium 199+20% FCS menghasilkan perkembangan oosit yang lebih baik daripada medium 199 (82,43±6,59%; 80,75±9,68% vs 70,42±8,83%) (P<0,05). Analisis morfologi oosit setelah maturasi *in vitro* menunjukkan bahwa medium 199+20% FL menghasilkan oosit dengan abnormalitas terendah (11,49%), diikuti oleh medium 199+20% FCS dan medium 199 (13,92 dan 14,08%). Disimpulkan bahwa suplementasi 20% FL pada medium 199 menghasilkan kuantitas dan kualitas *mature* oosit kambing bligon lebih baik dibandingkan dengan medium 199 dengan 20% FCS maupun tanpa suplementasi.

Kata kunci: medium maturasi, cairan folikuler, oosit kambing bligon, maturasi *in vitro*

ABSTRACT

The research was conducted to examine the influence of maturation medium on the *in vitro* developmental competence of bligon goat oocytes. Goat ovaries were obtained from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in a flask of saline (0.9% NaCl) at temperature 31-34° C. Follicles of 2-6 mm in diameter were aspirated with 23 G needle and syringe 3 ml. The oocyte with more than 2 layer of cumulus cells were used in this research. Oocytes were washed 3 times with *dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) and *tissue culture medium* 199 (TCM 199). The oocytes were then distributed into 50 µl different maturation medium, i.e. TCM 199 (medium 199, without supplementation), medium 199+20% fetal calf serum (FCS), medium 199+20% follicular fluid (FL), and covered with mineral oil. The oocytes then subsequently incubated at 38° C, humidity 95%, and 5% CO₂ for 24 hours. Data was analyzed by using one way Anova. The oocytes quality after maturation were analyzed descriptively based on morphology. The results showed that medium 199+20% FC and medium 199+20% FCS produced better oocytes than medium 199 (82.43±6.59%; 80.75±9.68% vs 70.42±8.83%) (P<0.05). Morphological analysis of oocytes after *in vitro* maturation suggested that medium 199+20% FL produced the lowest abnormalities of oocytes (11.49%), followed by 199+20% FCS and 199 (13.92 and 14.08%). In conclusion, supplementation of 20% FL into medium 199 produced quantity and quality mature oocytes of bligon goat better than the 199 medium with 20% FCS or without supplementation.

Keywords: maturation medium, follicular fluid, bligon goat oocytes, *in vitro* maturation

PENDAHULUAN

Ovarium merupakan hasil samping rumah potong hewan (RPH), dapat dimanfaatkan sebagai sumber oosit. Oosit yang diperoleh dari koleksi ovarium tersebut memiliki stadium yang beragam dan *immature* sehingga perlu dimaturasi secara *in vitro*. Namun hasil maturasi oosit *in vitro* tidak selalu memuaskan. Ukuran folikel, hormon, serum, dan faktor pertumbuhan dalam medium maturasi *in vitro* serta kondisi kultur sangat berpengaruh terhadap keberhasilan maturasi oosit (Velilla *et al.*, 2002 yang disitasi Rahman *et al.*, 2008).

Serum merupakan bagian plasma darah tanpa fibrinogen atau faktor-faktor penggumpalan lain. Serum digunakan sebagai suplementasi dalam medium maturasi *in vitro* karena mengandung faktor pertumbuhan, hormon, dan peptida yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan oosit

(Wani, 2002 yang disitasi Rahman *et al.*, 2008). Crozet *et al.* (2000), Gordon (2003), dan Velilla *et al.* (2002) yang disitasi Rahman *et al.* (2008) menyebutkan ada beberapa jenis *bovine serum* yang sering digunakan dalam medium maturasi *in vitro*, yaitu *fetal calf serum* (FCS), *steer serum* (SS), dan *estrus goat serum* (EGS) homolog maupun heterolog. *Bovine serum* dalam bentuk FCS, sering digunakan sebagai sumber protein utama dalam maturasi *in vitro*. *Bovine serum albumin* (BSA) dan berbagai bentuk *bovine serum* merupakan yang paling sering digunakan dalam medium maturasi (Gordon, 2003). Selanjutnya dikemukakan bahwa FCS memberikan hasil yang baik sebagai suplemen protein dalam medium maturasi *in vitro* dan mampu mendukung *follicle stimulating hormone* (FSH) yang ditunjukkan oleh viabilitas dan ekspansi sel-sel kumulus.

Cairan folikel adalah cairan yang mengisi folikel antrum dan mengelilingi ovum dalam folikel ovarium,

cairan ini banyak mengandung asam hialuronat. Cairan folikel menyediakan lingkungan mikro yang sangat penting bagi perkembangan oosit. Cairan folikel merupakan produk kedua dari transfer konstituen plasma darah yang melintasi penghalang darah folikel dan aktivitas yang keluar dari granulosa dan sel teka (Revelli *et al.*, 2009). Komposisi cairan folikel terdiri atas faktor-faktor yang menstimulasi kematangan oosit, seperti *insulin-like growth factor I* (IGF-I), *IGF-binding proteins* (IGFBP_s), FSH, *luteinizing hormone* (LH), estrogen, progesteron, dan estradiol (Hafez dan Hafez, 2000; Gordon, 2003; Ubaidullah *et al.*, 2009). Berdasarkan hasil penelitian Tabatabaei dan Mamoei (2010), komposisi biokimia cairan folikuler dalam folikel besar (diameter 10-22 mm) antara lain kalsium, fosfor, glukosa, urea, kreatinin, kolesterol, trigliserida, protein, albumin, globulin, alkalin fosfatase (ALK), laktat dehidrogenase (LDH), aspartat aminotransferase (ASAT), dan alanin aminotransferase (ALAT). Hasil penelitian Sogorescue *et al.* (2010) menunjukkan suplementasi 10% cairan folikuler pada medium 199 menghasilkan perkembangan oosit domba dan kambing yang lebih baik dibandingkan dengan medium 199 dengan suplementasi *epidermal growth factor* (EGF) ataupun tanpa suplementasi.

MATERI DAN METODE

Koleksi Cairan Folikel

Cairan folikel diambil dari folikel-folikel de Graft. Cairan folikel disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil kemudian disentrifus dengan kecepatan dan periode yang sama sebanyak 2 kali. Selanjutnya, supernatan difilter dan disimpan di dalam refrigerator.

Koleksi Oosit

Ovarium kambing yang diperoleh dari RPH dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis dalam termos. Seluruh permukaan ovarium terendam larutan. Ovarium tersebut dibawa ke laboratorium 3 jam setelah penyembelihan. Ovarium masih dapat digunakan untuk maturasi *in vitro* sampai 11 jam apabila disimpan dalam larutan NaCl fisiologis dengan suhu 25° C. *Syringe* 3 ml diisi medium sebanyak 1 ml untuk menjaga oosit yang diambil tetap berada dalam medium. Jarum diarahkan ke folikel yang diinginkan, folikel ditusuk kemudian disedot secara perlahan dan akurat untuk mengurangi kerusakan oosit.

Pencucian Oosit

Sebelum digunakan, diameter pipet diperiksa di bawah mikroskop untuk memastikan oosit dapat melaluinya dengan mudah tanpa menimbulkan kerusakan pada oosit dan sel-sel kumulusnya. Oosit hasil aspirasi diambil dari *tissue culture dish* (TCD) penampungan menggunakan pipet aspirasi, kemudian dipindahkan pada *drop* DPBS.

Klasifikasi oosit *immature* dilakukan berdasarkan morfologinya, yaitu: 1) oosit yang masih diselubungi sel-sel kumulus dengan utuh, 2) oosit yang hanya sebagian diselubungi sel-sel kumulus, 3) oosit yang tidak diselubungi sel-sel kumulus atau oosit gundul, 4) oosit yang diselubungi fibrin, dan 5) ooplasma kecil yang diselubungi sel-sel kumulus. Dalam penelitian ini digunakan oosit kelas satu dan kelas dua.

Maturasi *In Vitro* (IVM)

Oosit dicuci 3 kali dengan DPBS dan TCM 199, kemudian didistribusikan ke dalam 50 µl medium maturasi yang berbeda, yaitu TCM 199 (tanpa suplementasi), medium 199 + 20% FCS, medium 199 + 20% FL, dan ditutup dengan minyak mineral. Selanjutnya oosit diinkubasi pada 38° C, kelembaban udara 95%, dan 5% CO₂ selama 24 jam.

Evaluasi Maturasi Oosit

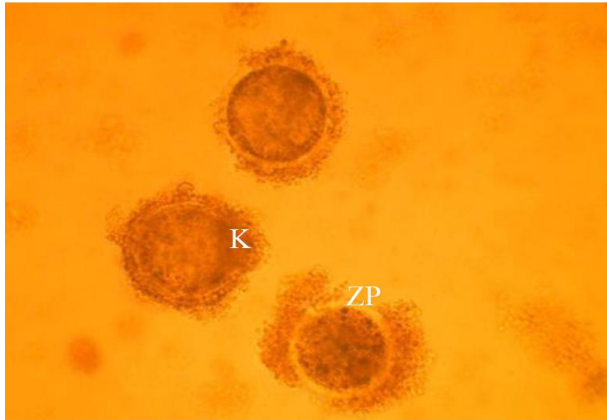
Evaluasi maturasi oosit dilakukan di bawah mikroskop stereo setelah diinkubasi 24 jam. Persyaratan oosit yang telah masak sesuai dengan morfologi oosit hasil maturasi *in vivo*, yaitu ruang *perivitelline* kecil, sel-sel kumulus menyebar tanpa terjadi degenerasi sel dan strukturnya jelas. Salah satu tanda oosit yang telah masak adalah adanya ekspansi sel-sel kumulus, selain *germinal vesicle break down* dan ekstrusi *first polar body* (Hafez dan Hafez, 2000; Gordon, 2003).

Analisis Data

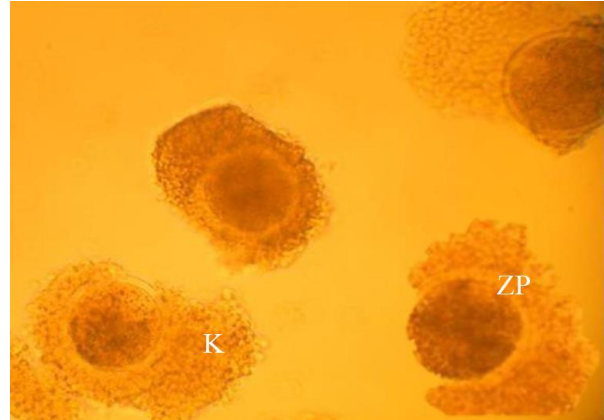
Data kemampuan maturasi *in vitro* dianalisis menggunakan analisis varian satu arah. Data persentase oosit yang mengalami kerusakan setelah maturasi dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

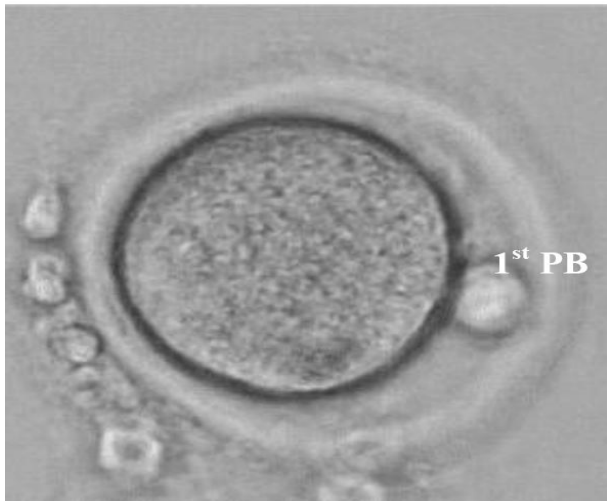
Oosit *immature* mempunyai sel kumulus yang rapat mengelilingi *zona pellucida* (ZP) disajikan pada Gambar 1. Kualitas oosit sangat memengaruhi tingkat maturasi yang dihasilkan. Oosit dengan morfologi bagus, yaitu sel kumulus berlapis-lapis, kompak, ooplasma homogen, penampilan *cumulus oocyte complex's* (COC) terang dan transparan, serta adanya ZP yang intak (Rajikin *et al.*, 1994 yang disitasi Rahman *et al.*, 2008) menghasilkan lebih banyak oosit yang matang setelah IVM. Telah diketahui bahwa hubungan antara sel-sel kumulus dan oosit sangat penting, tidak hanya dalam proses maturasi oosit ke stadium metafase II tetapi juga pada maturasi sitoplasma yang diperlukan untuk perkembangan oosit setelah fertilisasi (Gustari *et al.*, 2009). Interaksi sel kumulus dan oosit menghasilkan glikosaminoglikan, hormon steroid, nutrisi, dan faktor-faktor lain yang mendukung maturasi oosit. Pada oosit *mature* tampak ekspansi sel-sel kumulus yang merenggang mengelilingi oosit (Gambar 2) dan pada beberapa oosit dapat dilihat adanya ekstrusi *first polar body* (Gambar 3).



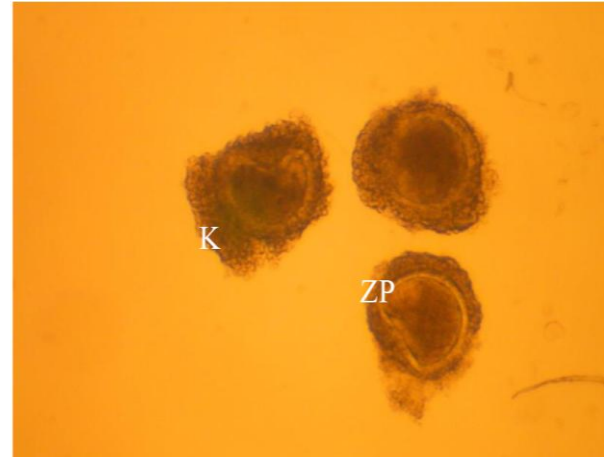
Gambar 1. Oosit kambing bligon *immature* (Sel-sel kumulus rapat mengelilingi zona pellucida, 40x, K=sel-sel kumulus, ZP=zona pellucida)



Gambar 2. Oosit kambing bligon *mature* (Terjadi ekspansi sel-sel kumulus. 40x, K=sel-sel kumulus, ZP=zona pellucida)



Gambar 3. Oosit *mature* (Terjadi ekstruksi *first polar body* (1st PB) sebagai indikasi terjadinya metaphase II, 80x)



Gambar 4. Oosit kambing bligon yang rusak setelah proses maturasi *in vitro* (Tampak tidak terjadi ekspansi sel-sel kumulus, zona pellucida mengkerut, dan fragmentasi dalam sitoplasma, 40x, O=oosit, K=sel-sel kumulus, ZP=zona pellucida)

Gordon (2003) melaporkan bahwa tanda oosit yang *mature* adalah adanya ekspansi sel-sel kumulus, *germinal vesicle break down* dan ekstrusi *first polar body*. Ekspansi sel-sel kumulus merupakan tanda oosit *mature* yang paling mudah terlihat. Ekspansi sel-sel kumulus sangat penting bagi keberhasilan fertilisasi karena dapat membantu migrasi spermatozoa di antara sel-sel kumulus (Widayati *et al.*, 2007). Ekspansi sel-sel kumulus bertepatan dengan terjadinya meiosis. Sel-sel kumulus distimulasi oleh FSH dan *growth factor* untuk memproduksi dan mensekresikan *hyaluronic acid* yang menyebabkan ekspansi. Veeck (1998) yang disitasi Rahman *et al.* (2008) lebih lanjut menyebutkan bahwa ekspansi sel-sel kumulus dapat digunakan sebagai indikator morfologi kualitas oosit dalam maturasi *in vitro*. Ekspansi sel kumulus mengindikasikan oosit *mature* dan memiliki kualitas yang baik. Gandolfi *et al.* (2005) menyatakan komunikasi antara oosit dan sel-sel kumulus, dan antara individual sel kumulus, terjadi melalui saluran membran khusus (*gap junctions*) yang memungkinkan terjadinya transfer molekul-molekul. Molekul-molekul yang terlibat dalam komunikasi seluler meliputi

metabolit glukosa, asam-asam amino, dan nukleotida-nukleotida. *Cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) dan purin berperan secara khusus yaitu mengatur proses meiosis oosit pada saat ovulasi atau maturasi *in vitro*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium 199+20% FL dan medium 199+20% FCS menghasilkan perkembangan oosit yang lebih baik daripada medium 199 ($82,43 \pm 6,59\%$; $80,75 \pm 9,68\%$ vs $70,42 \pm 8,83\%$) ($P < 0,05$). Sogorescue *et al.* (2010) melaporkan suplementasi FL pada medium 199 menghasilkan perkembangan oosit domba dan kambing yang lebih baik dibandingkan EGF pada medium 199 ataupun tanpa suplementasi. Ratnaningsih (2009) juga melaporkan bahwa suplementasi cairan folikel kambing berpengaruh secara nyata terhadap kemampuan maturasi *in vitro* oosit kambing. Cairan folikel mengandung hormon protein yaitu FSH, LH, dan prolaktin. Hormon FSH dan *growth factor* akan memproduksi dan mensekresikan *hyaluronic acid* yang memengaruhi ekspansi sel-sel kumulus dan perkembangan oosit (Bearden dan Fuquay, 1997; Revelli *et al.*, 2009). Serum digunakan sebagai

suplementasi dalam medium maturasi *in vitro* karena mengandung faktor pertumbuhan, hormon, dan peptida yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan oosit (Wani, 2002 yang disitasi Rahman *et al.*, 2008). Meningkatnya konsentrasi serum diduga akan meningkatkan konsentrasi berbagai komponen pemicu terjadinya proses maturasi yang terkandung di dalam serum seperti hormon, protein, dan energi sehingga memberikan hasil optimal pada proses maturasi (Rao *et al.*, 2002; Wattimena *et al.*, 2006).

Analisis morfologi oosit setelah maturasi *in vitro* menunjukkan bahwa medium 199 + 20% FL menghasilkan degeneratif oosit terendah (11,49%), diikuti oleh medium 199 + 20% FCS dan medium 199 (13,92% dan 14,08%). Pada degeneratif oosit menunjukkan ZP yang tidak intact, tidak terjadi ekspansi sel-sel kumulus (Gambar 4). Sel-sel kumulus berperan penting dalam maturasi oosit dengan menempatkan oosit dalam penahanan meiosis, memicu kembali meiosis, dan mendukung maturasi sitoplasma. Fungsi-fungsi tersebut disebabkan *gap junctions* dan kemampuan metabolisme spesifiknya. *Gap junctions* penting untuk pertumbuhan oosit *in vitro*, tanpa adanya *gap junctions* oosit tumbuh sangat kecil dan setelah beberapa hari dalam kultur akan mengalami nekrosis karena secara normal oosit tergantung pada sel-sel granulosa untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya (Gondolfi *et al.*, 2005; Widayati *et al.*, 2007).

Keberhasilan maturasi *in vitro* sangat ditentukan oleh sistem yang digunakan. Sistem maturasi *in vitro* pada kondisi temperatur 38,5° C dan 5% CO₂ serta kelembaban yang tinggi akan menyebabkan oosit dan embrio terekspos oleh konsentrasi oksigen dan cahaya yang tinggi, sehingga dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Produksi ROS pada konsentrasi yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan seluler (Agarwal *et al.*, 2005), kerusakan lemak, menghambat sintesis protein, dan pengurangan *adenosin triphosphate* (ATP) (Gupta *et al.*, 2009). Livingston *et al.* (2009) menyatakan bahwa secara *in vivo*, ROS dapat dikontrol dengan adanya anti-oksidan yang secara alamiah dihasilkan di dalam tubuh. Beberapa peneliti melaporkan konsentrasi ROS dalam cairan folikel dapat mewakili rentang alami pro-oksidan yang diperlukan untuk perkembangan normal oosit. Sejumlah fisiologis ROS mungkin menunjukkan oosit berkembang sehat, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menunjukkan keadaan *oxidative stress* (OS) dan menekan hasil *in vitro fertilization* (Pasqualotto *et al.*, 2004; Wiener-Megnazi *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Suplementasi 20% FL pada medium 199 menghasilkan kuantitas dan kualitas oosit *mature* kambing bligon lebih baik dibandingkan dengan medium 199 dengan 20% FCS maupun tanpa suplementasi. Persentase kerusakan oosit terbesar didapatkan pada medium maturasi oosit tanpa suplementasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., S. Gupta, and R. K. Sharma. 2005. Role of oxydative stress in female production. **Reproduct. Biol. Endocrinol.** 3:1-21.
- Bearden, H. J. and J.W. Fuquay. 1997. **Applied Animal Reproduction**. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Crozet, N., M. Dahirel, and L. Gall. 2000. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 118:367-373.
- Gandolfi F., T.A.L. Brevini, F. Cillo, and S. Antonini. 2005. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Int. Office Epizoot.** 24(1):413-423.
- Gordon, I. 2003. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. 2nd ed. CAB International, UK.
- Gupta, S., N. Malhotra, D. Sharma, A. Chandra, and A. Agarwal. 2009. Oxydative stress and its role in female infertility ans assisted reproduction: Clinical implication. **Int. J. Fertil. Steril.** 2(4):147-164.
- Gustari, S., N.W.K. Karja, Y.R. Amelia, I. Kurniawan, dan B. Sulisty. 2009. Tingkat maturasi *in vitro* oosit kambing dalam medium dengan suplementasi serum dan albumin. **J. Veteriner** 10(4):194-197.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In **Reproduction in Farm Animals**. B. Hafez (Ed.). 7th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Livingston, T., K. Rich, S. MacKenzie, and J.D. Godkin. 2009. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in vivo* matured sheep oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** 116:265-273.
- Pasqualotto, E.B., A. Agarwal, R.K. Sharma, V.M. Izzo, J.A. Pinotti, N.J. Joshi, and B.I. Rose. 2004. Effect of follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. **Fertil. Steril.** 81:973-976.
- Rahman, A.N.M.A., R.B. Abdullah, and W.E. Wan-Khadajah. 2008. *In vitro* maturation of oocytes with special reference to goat: A Review. **Biotechnol.** 7(4):599-611.
- Rao, B.S., K.S. Naidu, D. Amarnoth, R. Vagdevi, A.S. Rao, K.V. Brahmaiah, and V.H. Rao. 2002. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding season. **Small Ruminant Research.** 43:31-36.
- Ratnaningsih. 2006. Pengaruh Cairan Folikel pada Medium TCM-199 terhadap Maturasi Oosit Kambing Jawa secara *In Vitro*. **Skripsi**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang. Malang.
- Revelli A., D.P. Luisa, S.M. Emanuela, M. Marco, and R. Paolo. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproduct. Biol. Endocrinol.** 7(40):1-13.
- Sogorescu, E., S. Zamfirescu, A.H. Anghel, and D. Nadolu. 2010. The influence of new media on the developmental competence of goat and sheep oocytes. **Romanian Biotechnological Letters** 15(3):19-25.
- Tabatabaei, S. and M. Mamoei. 2011. Biochemical compocition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. **Comparative Clin. Patol.** 20:441-445.
- Ubaidullah, L.A.L., A. Sohail, S. Shoaib, and Y. Khan. 2009. *In vitro* maturation of oocyte in different maturation media containing oestrous buffalo serum, oestrus cow serum and follicular fluid buffalo. **Pakistan J. Zool.** 9:213-218.
- Wattimena, J., T.R. Tagama, dan B. Hadisutanto. 2006. Pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap tingkat maturasi oosit domba *in vitro*. **J. Anim. Product.** 8(2):94-99.
- Widayati, D.T., Kustono, S. Bintara, W. Asmarawati, dan Ismaya. 2007. Gametogenesis dan Transpor Gamet. <http://elisa.ugm.ac.id/community/show/ilmu-reproduksi-ternak-fapet-oleh-diah-tri-widayati/>.
- Wiener-Megnazi Z., L.Vardi, A. Lissak, S. Shnizer, A.Z. Reznick, D. Ishai, S. Lahav-Baratz, H. Shiloh, M. Koifman, and M. Dimfeld. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in-vitro fertilization. **Fertil. Steril.** 82(3):1171-1176.